基于 LC-MS/MS 分析马缨杜鹃花代谢物的变化

武绍龙[1,2,3]，唐明[1,2,3]，张习敏[1,2,3]，唐婧[1,2,3*]

（1. 贵州师范大学生命科学学院，贵阳 550025；2. 贵州师范大学，贵州省植物生理与发育调控重点实验室，贵阳 550025；3. 贵州师范大学，国家林业局西南喀斯特山地生物多样性保护重点实验室，贵阳 550025）

摘要：为分析马缨杜鹃（*Rhododendron delavayi*）花开花至凋谢进程中的代谢产物差异及其通路，该文采用 LC-MS/MS 技术对其花苞期、开裂期、传粉期、盛开期、衰老期和凋谢期的化学成分进行非靶向代谢组学分析。结果表明：（1）共鉴定到 973 种代谢物，主要包含黄酮类、有机酸、酚酸类、氨基酸及其衍生物、脂类、生物碱等。（2）主成分分析（PCA）表明样本间代谢物存在差异，结合正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）、t 检验的 P 值和单变量分析的差异倍数（fold-change，Fc）筛选差异代谢物（$VIP > 1$，$P < 0.05$，$Fc > 2$ 或 $Fc < 0.5$），涉及 591 种，在马缨杜鹃花期进入衰老期和凋谢期后差异代谢物数量和表达量显著上升，其中花苞期至开裂期差异代谢物的表达主要呈现下调，而进入衰老期和凋谢期后差异代谢物的表达主要呈现上调。（3）KEGG 注释到 68 条代谢通路，其中差异代谢物极显著富集（$P < 0.01$）通路 3 条，包括苯丙素类生物合成、植物激素的生物合成和类黄酮生物合成。（4）结合苯丙素类、黄酮类等有效成分生物合成通路共筛选到 10 种代谢物包括苯丙氨酸（L-phenylalanine）、反式肉桂酸（trans-cinnamic acid）、查耳酮（chalcone）、柚皮素（naringenin）、对香豆酰基莽草酸（p-coumaroyl shikimic acid）、阿魏酸（ferulic acid）、松柏醇（coniferyl alcohol）、芥子酸（sinapic acid）、紫丁香苷（syringin）、槲皮素（quercetin）. 此外，有效成分的差异代谢物表明苯丙素类生物合成代谢活动随马缨杜鹃花的发育逐渐增强，而黄酮类化合物生物合成逐渐减弱，这些关键的差异代谢物可能对马缨杜鹃花的发育有重要的调控作用。该研究为马缨杜鹃花开花至凋谢进程中的有效成分代谢途径活性物质的研究提供了代谢组学基础，为进一步研究马缨杜鹃花花期调控的分子机理提供参考。

关键词：马缨杜鹃，花期，代谢组，LC-MS/MS，代谢通路

中图分类号：Q945.1　　**文献标识码：**A　　文章编号：

Based on LC-MS/MS analysis of metabolites change from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*

收稿日期：2021-12-21

基金项目：国家自然科学基金-贵州省喀斯特科学研究中心联合基金项目（U1812401）；贵州省科技支撑计划项目（黔科合支撑[2021]一般 459）； 喀斯特山地生态安全工程研究中心（黔教科合 KY 字[2021]007）；百里杜鹃景区杜鹃花腐病绿色防控技术研究（黔林科合[2019]10 号）[Supported by National Natural Science Foundation of China-Guizhou Province Karst Science Research Center Joint Fund Project (U1812401); Guizhou Province Science and Technology Support Plan Project (qkhzc[2021]yb459); Karst Mountain Ecological Security Engineering Research Center (qjkh KY [2021]007); Study on Green Control Technology of *Rhododendron* Rot in Baili Rhododendron Scenery Spot (qlkh [2019] No.10)]。

作者简介：武绍龙（1995-），硕士研究生，研究方向为代谢组学，（E-mail）3063166501@qq.com。

***通信作者：**唐婧，博士，高级实验师，研究方向为生物信息学，（E-mail）tangjing2016@gznu.edu.cn。

WU Shaolong[1,2,3], TANG Ming[1,2,3], ZHANG Ximin[1,2,3], TANG Jing[1,2,3]*
（1. *School of Life Science*, *Guizhou Normal University*, Guiyang 550025, China; 2. *Key Laboratory of Plant Physiology and Developmental Regulation*, *Guizhou Normal University*, Guiyang 550025, China; 3. *Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Karst Mountainous Areas of Southwestern China*, *Guizhou Normal University*, Guiyang 550025, China）

Abstract: In order to analyze the differences of metabolites and their pathways from flower opening to withering of *Rhododendron delavayi*, we used LC-MS/MS material separation and identification technique to non-targeted the chemical components of bud stage, dehiscence stage, pollination stage, blooming stage, senescence stage and withering stage. The results were as follows: (1) A total of 973 kinds of metabolites were detected, mainly including flavonoids, organic acids, phenolic acids, amino acids and their derivatives, lipids, alkaloids and so on. (2) Principal component analysis (PCA) shows that there were differences in metabolites among samples. Combined with orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), *P* value of *t*-test and fold change (*Fc*) of univariate analysis, differential metabolites ($VIP > 1$, $P < 0.05$, $Fc > 2$ or $Fc < 0.5$) were screened out, involving 591 species, the quantity and expression of differential metabolites increased significantly after the *Rhododendron delavayi* flower stage entered the senescence stage and the withering stage, in which the expression of differential metabolites from bud stage to dehiscence stage was mainly down-regulated, while the expression of differential metabolites was mainly up-regulated after entering senescence stage and withering stage. (3) 68 differential metabolic pathways were annotated by KEGG, of which 3 pathways were significantly enriched with differential metabolites ($P < 0.01$), including phenylpropanoids biosynthesis, plant hormone biosynthesis and flavonoid biosynthesis. (4) Based on the analysis of biosynthetic pathways of phenylpropanoids, flavonoids and other effective components, 10 kinds of differential metabolites were screened from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*, including L-phenylalanine, trans-cinnamic acid, chalcone, naringenin, p-coumaroyl shikimic acid, ferulic acid, coniferyl alcohol, sinapic acid, syringin and quercetin. In addition, the differential metabolites of effective components showed that phenylpropanoids biosynthesis and metabolism activities gradually increased with the development of *Rhododendron delavayi*, while flavonoid biosynthesis gradually decreased. These key differential metabolites may play an important role in regulating the development of *Rhododendron delavayi*. This research provides a metabonomic basis for the study of effective components in the metabolic pathway during the flowering and withering process of *Rhododendron delavayi*, and provides a reference for the further study of the molecular mechanism of flowering regulation of *Rhododendron delavayi*.

Key words: *Rhododendron delavayi*, flowering period, metabolome, LC-MS/MS, metabolic pathway

马缨杜鹃（*Rhododendron delavayi*）属于常绿灌木或小乔木，因其花色鲜艳、形状酷似马头饰的璎珞而得名，主要分布于西南地区，包括四川西南部、云南全省和贵州西北部等（张长芹 等，2015），其中贵州西北部以百里杜鹃的普底和金坡景区分布最为广泛，为主要的建群种和优势种（李苇洁和陈训，2005）。每年 3 月中旬前完成初花期（花瓣开始开张到 10%花序开放）；3 月下旬到 4 月初进入为盛开期（10%花序开放到 10%花序出现凋谢）；4 月中旬进入凋谢期（10%花序出现凋谢到 70%花序出现凋谢），马缨杜鹃整个花期约为 25 ～ 30 天。研究马缨杜鹃花开花至凋谢进程中的代谢组分变化，对延长和调节马缨杜鹃花期，

充分发挥马缨杜鹃的观赏价值和经济价值，对贵州省地方经济以及乡村振兴具有极其重要的研究意义。目前关于马缨杜鹃花主要包括花特征和花粉性状的研究，以百里杜鹃保护区马缨杜鹃为实验材料研究花特征分化和资源分布情况（胡德美 等，2021）；用显微镜观察马缨杜鹃花粉形态大小、外壁纹饰、孔沟形态等性状（毛加宁，2000）。同时，在马缨杜鹃花花期调控的研究则主要集中于营养元素、植物激素和温度处理等方法，包括用不同浓度的 N、P、K、Ca 等营养元素处理马缨杜鹃观察对花芽发育和花期的影响（洪鲲 等，2010）；在马缨杜鹃花芽发育初期和开花前期喷施外源激素对始花期、盛开期、末花期和开花数的影响（宋庆发 等，2010）；通过不同浓度的生长调节物质及矿物质营养处理马缨杜鹃的花蕾，探索马缨杜鹃花花期调控方法（岳保超，2015）。目前仅有少量关于马缨杜鹃茎和根代谢物的研究报道，利用各种色谱技术从马缨杜鹃的茎分离鉴定得到 10 种化合物（徐金金 等，2012），然而马缨杜鹃花的发育进程中代谢物和代谢物途径研究还未见相关的报道。

近年来，植物代谢组学研究已经被广泛地应用于分析果树生长、发育、果实成熟过程中的代谢物变化（Aaron et al., 2008；Zhang et al., 2011；Li et al., 2020），目前也开始应用于研究植物花形成、发育的代谢机制研究（贾岩 等，2017；程少禹 等，2020），采用气相色谱-质谱法技术分析款冬花不同发育阶段代谢组，发现款冬花蕾发育过程中部分特征代谢物呈现显著的变化（薛水玉 等，2012）；利用转录组和代谢组研究铁皮石斛花的发育机制，发现次生代谢和碳水化合物的变化与花的发育有关（He et al., 2020）；采用 GC-MS 技术检测枇杷花发育进程中的代谢物质，揭示影响花发育进程的生理与代谢机制（徐红霞 等，2020）。代谢组学对植物花的发育代谢产物及代谢通路研究提供了方法。

本研究以贵州省毕节市大方县百里杜鹃风景区为研究区域，以马缨杜鹃花为研究对象，选取花苞期、开裂期、传粉期、盛开期、衰老期和凋谢期为材料，采用非靶向代谢组学（LC-MS/MS）分析方法，通过马缨杜鹃花开花至凋谢进程中 6 个阶段的代谢产物及代谢通路研究，拟探讨以下问题：（1）马缨杜鹃花开花至凋谢进程中不同阶段代谢物并且是如何变化的?（2）分析马缨杜鹃花差异显著的代谢物和相关的代谢通路；（3）筛选出与马缨杜鹃花发育相关的重要代谢物，该研究结果为马缨杜鹃花花期调控提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为贵州省毕节市大方县百里杜鹃风景区马缨杜鹃（*Rhododendron delavayi* Franch.）。

2020 年选取长势基本一致马缨杜鹃，分别在花苞期（3 月 20 日）、开裂期（3 月 24 日）、传粉期（3 月 30 日）、盛开期（4 月 3 日）、衰老期（4 月 10 日）、凋谢期（4 月 15 日），从 6 株树上采集适量马缨杜鹃花样本，经液氮冷冻后运回实验室进行代谢组学检测，每个时期取 6 个生物学重复样本。

1.2 马缨杜鹃花代谢物提取

基于液质联用（LC-MS/MS）技术（Warwick et al., 2011；Want et al., 2010）进行非靶向代谢组学研究。取 100 mg 液氮研磨的马缨杜鹃花样本，置于 EP 管中，加入 500 µL 含 0.1% 甲酸的 80%甲醇水溶液，涡旋震荡，冰浴静置 5 min，15 000 rpm、4 ℃离心 10 min，取 100 µL 的上清加超纯去离子水稀释至甲醇含量为53%，并置于离心管中15 000 g、4 ℃离心10 min，收集上清液，进样 LC-MS/MS 进行检测分析。

从每个实验样本中取等体积样本混匀作为 QC 样本。空白样本为含 0.1%甲酸的 53%甲醇水溶液代替实验样本，前处理过程与实验样本相同。

1.3 非靶向代谢组学（LC-MS/MS）检测

采用 Thermo Hyperil Gold column 色谱柱（C_{18}），柱温 40 ℃，流速 0.2 mL/min。正离子模式：流动相 A：0.1%甲酸，流动相 B：甲醇；负离子模式：流动相 A：5mM 醋酸铵（pH

9.0），流动相 B：甲醇；梯度洗脱（0 ～ 1.5 min，98%A，2%B；1.5 ～ 12 min，100%B；12 ～ 14 min，100%B；14 ～ 14.1 min，98%A，2%B；14.1 ～ 17.0 min，98%A，2%B）。进样量为 10 μL。利用 Thermo Vanquish UHPLC 液相色谱 Thermo QE 系列质谱分别进行正、负离子模式采集。扫描范围选择 m/z 70 ～ 1 050；ESI 源的设置如下：Spray Voltage：3.2 kV；Sheath gas flow rate：35arb；Aux Gasflow rate：10arb；Capillary Temp：320 ℃。Polarity：positive；negative；MS/MS 二级扫描为 data-dependent scans。每 10 个分析样本进行一次 QC 样本，评价整个实验过程中仪器状态的稳定性和检测数据结果的准确性。

1.4 数据分析

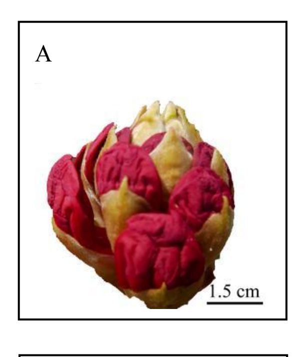
将采集到的原始数据导入 CompoundDiscoverer3.1（CD）软件中，通过保留时间、质荷比对数据进行过滤，然后根据保留时间偏差 0.2 min 和质量偏差 5 ppm 进行峰对齐，随后根据质量偏差 5 ppm、信号强度偏差 30%（Dai et al., 2017）等信息进行峰提取，同时对峰面积进行定量，再整合目标离子，然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测并与 mzCloud、mzVault 和 MassList 数据库进行比对，用 blank 样本去除背景离子，并对定量结果进行归一化，最后得到数据的鉴定和定量结果。

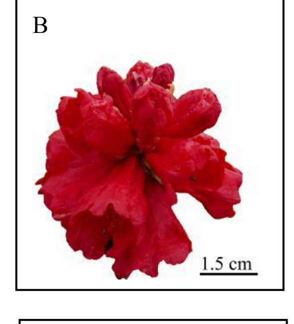
使用 MetaX（Wen et al., 2017）软件对数据进行对数转换处理，将所有实验样本和 QC 样本导入 SIMCA14.1 软件进行多元统计分析（阿基业，2010），采用主成分分析（PCA）观察各样本的整个过程的稳定性，然后进一步使用有监督的正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）来区分各组间代谢物的差异性。根据多变量 OPLS-DA 模型分析中变量权重（$VIP > 1$）、结合 t 检验的 P 值（$P < 0.05$）和单变量分析差异倍数（Fold-change，$Fc > 2$ 或 $Fc < 0.5$）筛选差异代谢物。维恩图由 TB tools 0.6 软件完成，代谢通路富集分析基于 KEGG 数据库。

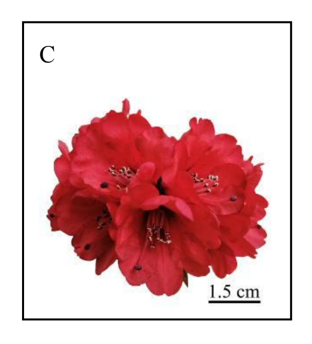
2 结果与分析

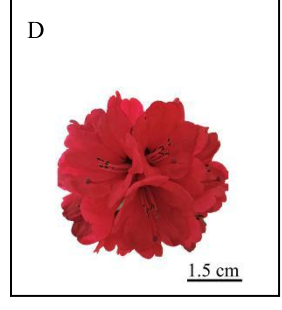
2.1 马缨杜鹃花开花至凋谢过程的形态变化

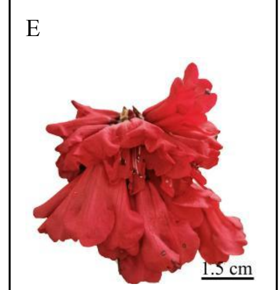
将马缨杜鹃花开花至凋谢过程分为 6 个时期，如图 1 所示。花苞期（A）：花未开，表现为花苞状态，内部花药还未成熟，雄蕊未开裂；开裂期（B）：花苞已经初步打开，雄蕊刚开裂，雌蕊柱头上未有花粉；传粉期（C）：花苞较为开发，雄蕊完全裂开，雌蕊柱头上已经结合覆盖花粉；盛开期（D）：花朵呈现完全盛开，颜色艳丽，雄蕊已经完全开裂，且花粉已经全部裂出，雌蕊柱头上花粉已经不多，传粉受精已完成；衰老期（E）：花朵开始凋谢，出现萎蔫状态；凋谢期（F）：花朵完全枯萎、凋谢和萎蔫。

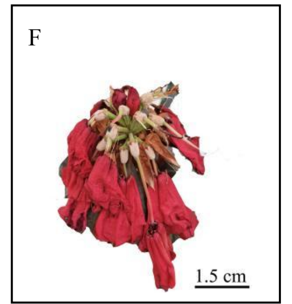












A. 花苞期；**B.** 开裂期；**C.** 传粉期；**D.** 盛开期；**E.** 衰老期；**F.** 凋谢期。

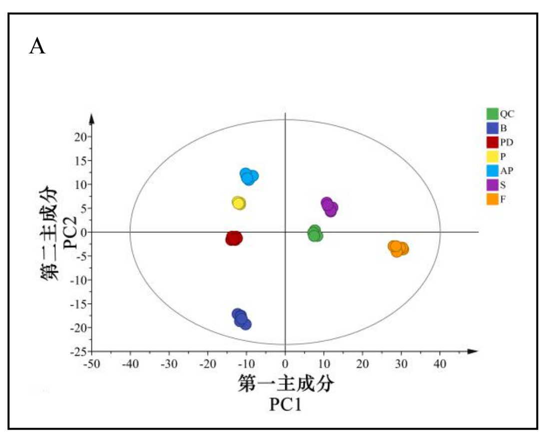
A. Bud stage；**B.** Dehiscence stage；**C.** Pollination stage；**D.** Blooming stage；**E.** Senescence stage；**F.** Withering stage.

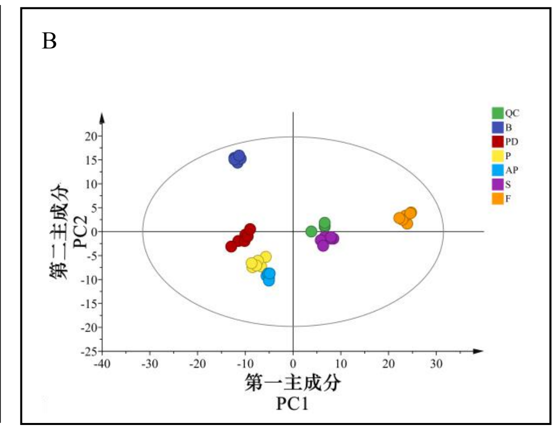
图 1　马缨杜鹃花开花至凋谢过程的形态变化

Fig.1　Morphological changes of *Rhododendron delavayi* from flowering to withering

2.2 马缨杜鹃花样本主成分分析

为分析马缨杜鹃花各个时期间代谢组的相互关系，采用主成分分析（PCA）通过建立数学模型进行正交变换简化降维分析样本间代谢谱的内部结构关系。马缨杜鹃花主成分分析（图 2：A 表示正离子模式，B 表示负离子模式），结果表明不同时期代谢物各组间存在明显的分离趋势，说明每个样本的数据处理结果是可信的，每个样本之间存在明显差异，且组内生物学重复重叠效果好，表明在实验过程中数据组的重现性好，可以用于后续差异代谢物分析。花苞期和开裂期、传粉期、盛开期代谢物的变化相对较大，衰老期与凋谢期的代谢物相对最大。





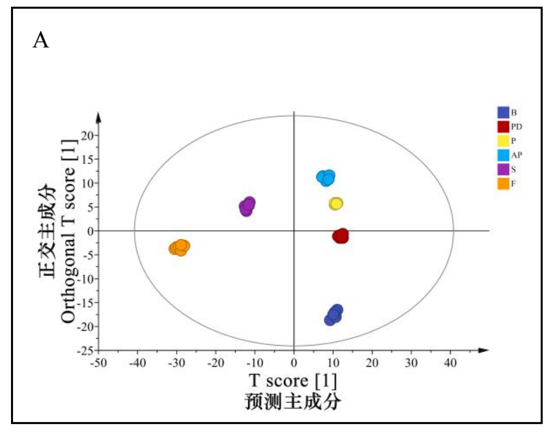
QC. 质控样本；**B.** 花苞期；**PD.** 开裂期；**P.** 传粉期；**AP.** 盛开期；**S.** 衰老期；**F.** 凋谢期。下同。

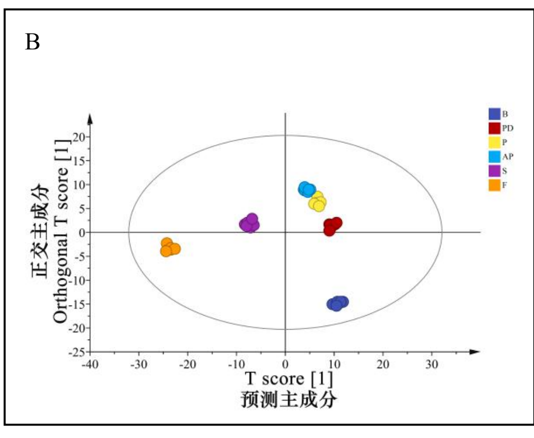
QC. Quality control sample；**B.** Bud stage；**PD.** Dehiscence stage；**P.** Pollination stage；**AP.** Blooming stage；**S.** Senescence stage；**F.** Withering stage. The same below.

图 2　马缨杜鹃花开花至凋谢进程中代谢物 PCA 模型得分图

Fig.2　PCA model scores of metabolites from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*

为筛选出马缨杜鹃开花至凋谢进程中的差异代谢物，采用正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）区分 6 个时期代谢物的总体差异，结果如图 3 所示。马缨杜鹃开花至凋谢进程中，花苞期、开裂期、传粉期、盛开期、衰老期、凋谢期 6 个时期的代谢物明显分离，表明各组样本代谢物存在显著性的差异变化。该模型质量参数 R^2 和 Q^2 均大于 0.9，说明当前 OPLS-DA 分析模型稳定可靠，具有良好的预测能力，有利于寻找潜在的马缨杜鹃开花至凋谢进程中的差异代谢物。





A. 正离子模式；**B.** 负离子模式。

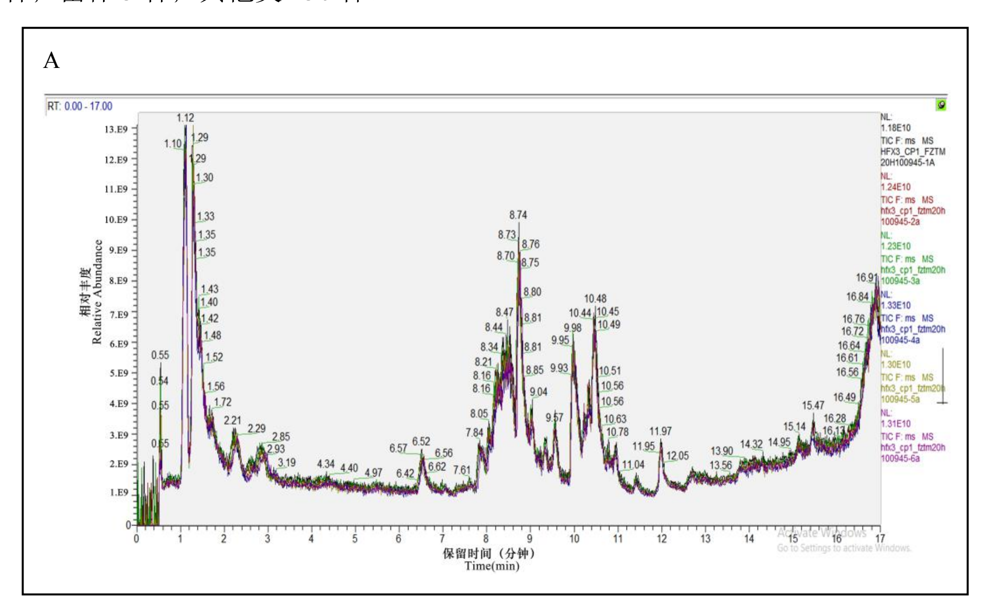
A. Positive ion mode；**B.** Negative ion mode.

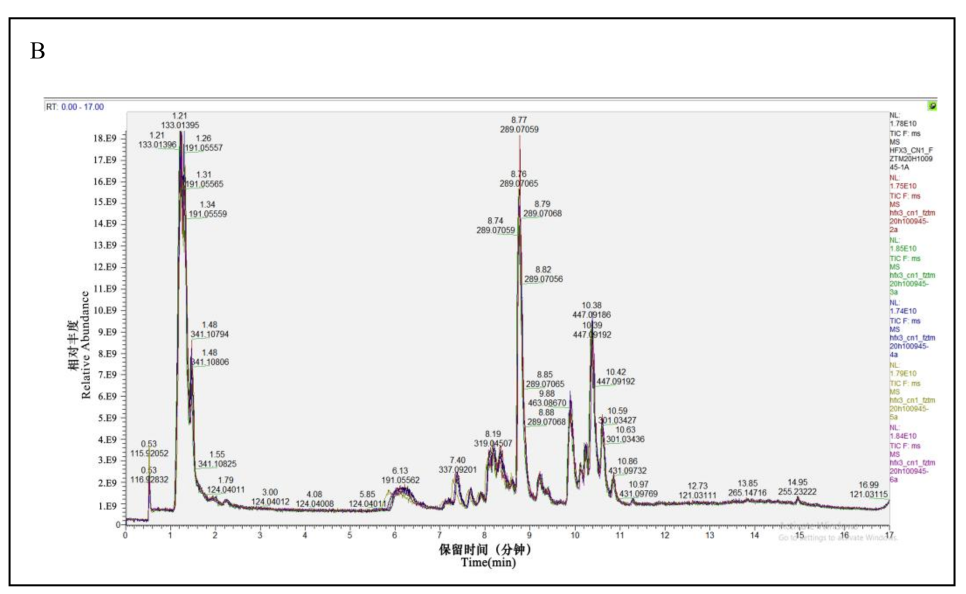
图 3 马缨杜鹃花开花至凋谢进程中代谢物 OPLS-DA 得分图

Fig.3 OPLS-DA scores of metabolite from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*

2.2 马缨杜鹃花代谢物分析

研究马缨杜鹃花开花至凋谢进程中代谢物的变化，采用 LC-MS/MS 检测马缨杜鹃花 6 个时期的代谢物多峰图，花苞期代谢物色谱图见图 4，其它时期代谢物峰图见附件 1。共检测到 973 种代谢物，正离子模式 587 种，负离子模式 386 种，其中黄酮类 114 种；有机酸 114 种；酚酸类 112 种；氨基酸及其衍生物 75 种；脂类 61 种；生物碱 57 种；萜类 45 种；核苷酸及其衍生物 43 种；糖类及其衍生物 36 种；苯丙素类 33 种；醇和多元醇 33 种；鞣质 11 种；甾体 3 种；其他类 236 种。





A. 正离子模式；**B.** 负离子模式。

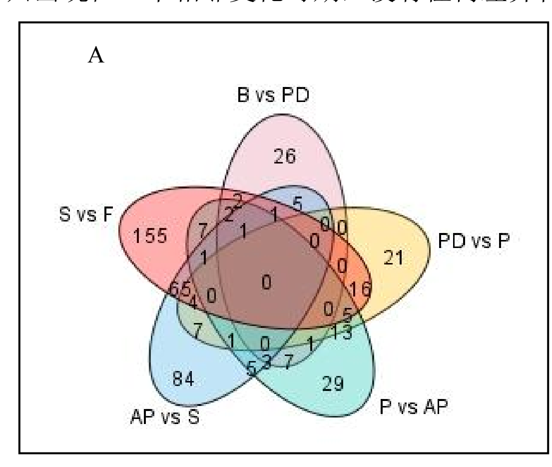
A. Positive ion mode；**B.** Negative ion mode.

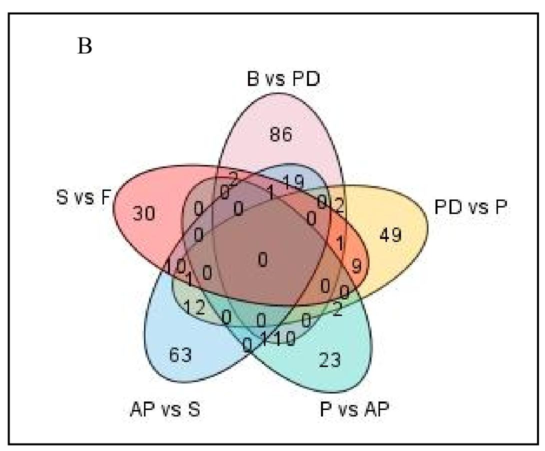
图 4　LC-MS/MS 代谢物检测多峰图

Fig.4　LC-MS/MS metabolite detection multimodal graph

2.3 差异代谢物分析

根据 OPLS-DA 模型的变量重要性投影值筛选马缨杜鹃花 6 个时期的差异代谢物（*VIP* > 1、*P* < 0.05 和 Fc （fold change） > 2 或 fold change < 0.5）。从花苞期、开裂期、传粉期、盛开期、衰老期到凋谢期进行相邻两个时期的代谢组比较，结果发现：马缨杜鹃花开花到凋谢进程中共有 591 种差异代谢物。其中，花苞期与开裂期有 170 种差异代谢物（正离子模式 87、负离子模式 83），48 种上调、122 种下调；开裂期与传粉期有 144 种差异代谢物（正离子模式 89、负离子模式 55），68 种上调、76 种下调；传粉期与盛开期有 111 种差异代谢物（正离子模式 67、负离子模式 44），75 种上调、36 种下调；盛开期与衰老期有 284 种差异代谢物（正离子模式 184、负离子模式 100），177 种上调、107 种下调；衰老期与凋谢期有 314 种差异代谢物（正离子模式 180、负离子模式 134），260 种上调、54 种下调。在马缨杜鹃花期进入衰老期和凋谢期后差异代谢物数量明显增多于开花过程，且大部分是表达量显著上升的差异代谢物。而在马缨杜鹃花苞期至开裂期过程中，差异代谢物中大部分的表达量显著下调。差异代谢物维恩图分析表明（图 5）：绝大部分（≥46.8 %）的差异代谢物都只出现在一个相邻变化时期，没有任何差异代谢物出现在整个开发至凋谢过程。





A. 上调代谢物；**B.** 下调代谢物。

A. Up-regulated metabolite；**B.** Down-regulated metabolite.

图 5　马缨杜鹃花开花至凋谢进程中差异代谢物维恩图

Fig. 5　Venn diagram of differential metabolites from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*

2.4 代谢通路分析

通过 KEGG Pathway 富集分析显著差异代谢物（Kanehisa & Goto, 2000；Jun Rao et al., 2014；Lin Hong et al., 2014），如图 6 所示。注释到 68 条代谢通路，显著代谢通路（*P* < 0.05）要有 6 条，分别是苯丙素类生物合成，植物激素的生物合成，类黄酮生物合成，精氨酸和脯氨酸代谢，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成鸟氨酸、赖氨酸和烟酸生物碱的生物合成。其中，极显著的代谢通路（*P* < 0.01）包括苯丙素类生物合成、植物激素的生物合成和类黄酮生物合成。

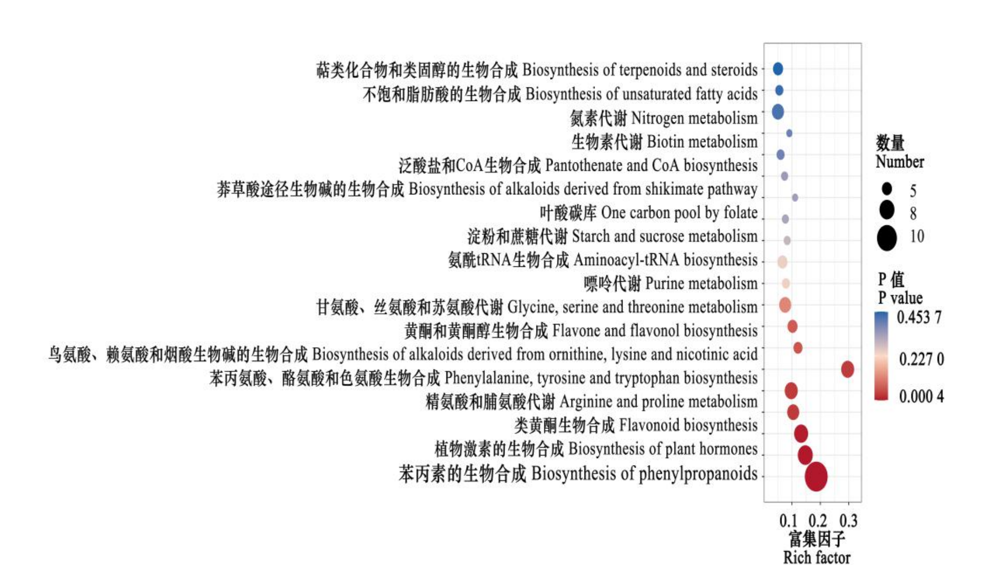


图 6　马缨杜鹃花开花至凋谢进程中差异代谢物主要代谢通路富集分析

Fig.6　Enrichment analysis of main metabolic pathways of differential metabolites from flowering to withering of *Rhododendron delavayi*

本研究根据代谢组学分析差异代谢物与代谢通路的关系，挖掘与马缨杜鹃花开花至凋谢相关的差异代谢物，推测代谢物可能的作用机制。结合代谢通路图（图 7），共筛选到 10 种差异代谢物，包括苯丙氨酸（L-phenylalanine）、反式肉桂酸（trans-cinnamic acid）、查耳酮（chalcone）、柚皮素（naringenin）、对香豆酰基莽草酸（p-coumaroyl shikimic acid）、阿魏酸（ferulic acid）、松柏醇（coniferyl alcohol）、芥子酸（sinapic acid）、紫丁香苷（syringin）、槲皮素（quercetin）。在马缨杜鹃花的 6 个时期，代谢物含量表达如图 6 所示，苯丙素类生物合成相关的差异代谢物包括苯丙氨酸（L-phenylalanine）、反式肉桂酸（trans-cinnamic acid）、对香豆酰莽草酸（p-coumaroyl shikimic acid）、松柏醇（coniferyl alcohol）、芥子酸（sinapic acid）、紫丁香苷（syringin）在衰老期（S）和凋谢期（F）两个时期均为上调表达，特别是在凋谢期（F）达到最高值；而黄酮类生物合成相关的代谢物柚皮素（naringenin）、槲皮素（quercetin）和查尔酮（chalcone）随着花的生长发育含量呈现下调表达。在‘夏黑’葡萄二季果冬芽分化关键时期，CCC 处理会诱导苯丙素合成和类黄酮合成通路中部分基因的上调或下调表达，通过改变与成花相关的基因表达和次级代谢产物的合成和代谢来实现促进成花（时晓芳　等，2021）。转录组学分析不同发育阶段款冬叶，发现叶片生长发育的过程中苯丙素类生物合成相关基因表达量不断增多（聂佳慧　等，2018）。马缨杜鹃花开花至代谢进程中苯丙素类代谢物表达量逐渐升高，而黄酮类代谢物表达量逐渐降低，苯丙素类和黄酮类代谢物表达可能与马缨杜鹃花发育有关。

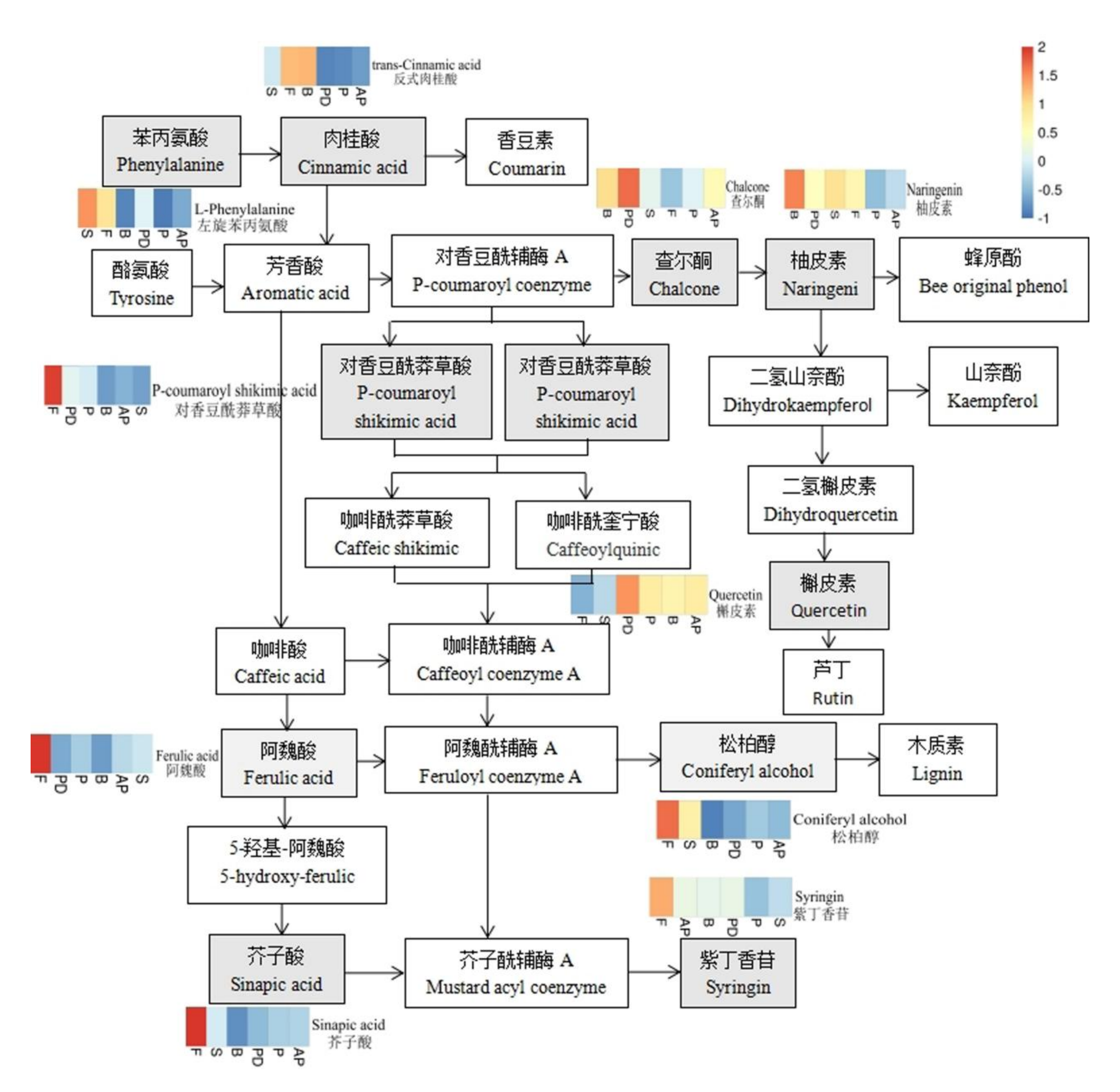


图 7　苯丙素类、黄酮类等有效成分生物合成通路

Fig. 7　Biosynthesis pathway of active components about phenylpropanes and flavones

3 讨论与结论

3.1 马缨杜鹃花差异代谢物

代谢物是生物体表型的基础，能帮助我们更直观有效地了解生物学过程及其机理（熊欢欢等，2019）。采用 GC-MS 技术对枇杷花整个发育进程中代谢物质分析，C/N 含量比是决定花发育进程的重要因素之一（徐红霞 等，2020）。长期以来马缨杜鹃花花期调控一直都是研究热点，马缨杜鹃花的开花至凋谢进程是十分复杂的生理过程，该过程可能与代谢物种类和含量密切相关。本研究采用非靶向代谢组学方法，研究马缨杜鹃花开花至凋谢的 6 个时期（花苞期；开裂期；传粉期；盛开期；衰老期和凋谢期）代谢物变化。通过代谢组学分析，共筛选获得 591 种差异表达代谢物，主要包括黄酮类、有机酸、酚酸类、氨基酸及其衍生物、脂质和生物碱等，这些差异代谢物在花的生长发育不同时期表达情况不相同，随着马缨杜鹃花的生长发育差异代谢物在花苞期至盛开期逐渐减少，进入衰老期和凋谢期后显著增加，而上调代谢物在整个开花至凋谢进程中逐渐增加，并且在凋谢期达到最大值，下调代谢物在花苞期至盛开期逐渐减少，衰老期增加，凋谢期减少，本研究马缨杜鹃花的不同发育阶段差异代谢物种类和表达可能与花的开花至凋谢进程密切相关。

3.2 马缨杜鹃花差异代谢通路

基于 KEGG Pathway 数据库对差异代谢物富集分析，注释到 68 条代谢通路，其中 3 条极显著的代谢通路（$P < 0.01$）分别是苯丙素类生物合成、植物激素的生物合成和类黄酮生物合成。其中苯丙素类生物合成是最显著的代谢通路，苯丙氨酸为下游次生代谢产物提供原料。本研究基于苯丙素类、黄酮类等有效成分生物合成通路共筛选获得 10 种有效成分生物合成有关的差异代谢物。进一步研究发现，苯丙素类生物合成相关的代谢物表达量同马缨杜鹃花的其他时期相比，在衰老期和凋谢期代谢物表达量逐渐升高，而黄酮类生物合成相关的代谢物随着花的生长发育含量呈现下调表达，这些代谢物可能与马缨杜鹃花凋谢有重要调控作用。在马缨杜鹃花的花苞期苯丙氨酸表达量相对较低，随着花的生长发育代谢物表达量逐渐升高，代谢通路上相关代谢也发生相应的变化，说明它对整个代谢通路的完成起到重要的调控作用。

现有研究发现，苯丙素类生物合成是最重要的植物次生代谢途径之一（Dong & Lin, 2021），植物的苯丙素类生物合成谢途径及其分支途径会产生许多次生代谢产物，如色素、酚酸、黄酮、类黄酮、木质素等（文欢 等，2017）。款冬花不同生长发育阶段的次生代谢物代谢组成明显不同，苯丙素类代谢物在发育初期至中后期表达量较高；黄酮类代谢物在发育的各个阶段表达量均有波动，但总体变化不大，次生代谢物累积促进花的发育（贾岩 等，2017）。采用高通量测序技术对川佛手不同发育时期转录组学研究，发现苯丙素生物合成中 7 个相关基因随着果实的发育及变色呈现显著的差异表达，提高其表达从而促进果实的发育（潘媛 等，2020）。苯丙素类生物合成途径的前端苯丙氨酸转化为反式肉桂酸，再由肉桂酸羟化酶（C4H）产生对羟基香豆酸，再经 4-香豆酰-CoA 连接酶（4CL）催化生成 4-香豆酸 CoA，进一步向下游特异性合成途径，转化为不同的苯丙素类代谢产物，包括香豆素、黄酮类、萜类和木质素等（王玉 等，2019）。在马缨杜鹃花开花至凋谢进程中苯丙素类生物合成相关的差异代谢物苯丙氨酸（L-phenylalanine）、反式肉桂酸（trans-cinnamic acid）、对香豆酰莽草酸（p-coumaroyl shikimic acid）、松柏醇（coniferyl alcohol）、芥子酸（sinapic acid）、紫丁香苷（syringin）代谢物随着花的生长发育含量呈现上调表达，特别是在凋谢期（F）达到最高值；而黄酮类生物合成相关的代谢物柚皮素（naringenin）、槲皮素（quercetin）和查尔酮（chalcone）在花的生长发育过程中下调表达。对不同发育时期大白菜花的转录组研究，发现花香的主要成分是苯丙素，而黄酮类化合物是花、果实和种子的主要显色物质，此外它还能影响花瓣的伸长，促进花粉的萌发（李改珍 等，2017）。在苯丙素类生物合成中 L-苯丙氨酸（侯思宇 等，2015）、柚皮素（Tu et al., 2016）、阿魏酸（Louie et al., 2010）等作为中间体，它们的表达量高低直接限制到下游代谢途径的进行，从而影响花的开花至凋谢过程。苯丙素类、黄酮类等代谢物作为重要次生代谢产物，推测其可能为马缨杜鹃花开花至凋谢进程有重要的调控作用。为了更好地了解代谢物的生物合成与马缨杜鹃花开花至凋谢进程中的关系，还需通过进一步的深入分子水平研究。

本研究通过非靶向代谢组学技术对马缨杜鹃花开花至凋谢进程中不同阶段的代谢成分进行分析，基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释并获得了相应通路，构建了马缨杜鹃花中苯丙素类、黄酮类等有效成分生物合成途径，为进一步研究代谢物的基因调控作用以及全面解析代谢途径提供代参考，为延长马缨杜鹃花花期调控机制提供了理论基础和科学依据。

参考文献：

AA JY, 2010. Analysis of metabolomics data: principal component analysis[J]. Chin J Clin Pharm Ther, 15(5): 481-489. [阿基业，2010. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学，15(5)：481-489.]

AARON F, KATI H, ROMINA B, et al., 2008. Reconfiguration of the achene and rceptacle

metabolic networks during strawberry fruit development[J]. Plant Physiolo, 148(2): 730-750.
CHENG SY, XUAN LJ, DONG B, et al., 2020. Identification of differential metabolic pathways and key regulatory genes in the two flower bud differentiation processes of *Magnolia liliiflora*[J]. Hortic Plant J, 47(8): 1490-1504. [程少禹，宣铃娟，董彬，等，2020. ‘红元宝’紫玉兰两次花芽分化差异代谢通路及关键调控基因筛选[J]. 园艺学报，47(8)：1490-1504.]
DAI WD, XIE DC, LU ML, et al., 2017. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach[J]. Food Res Inte, 96(96): 40-45.
DONG NQ & LIN HX, 2021. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions[J]. J Integr Plant Biol, 63(01): 180-209.
HE CM, LIU XC, LIU N, et al., 2020. Transcriptome sequencing and metabolite profiling analyses provide comprehensive insight into molecular mechanisms of flower development in *Dendrobium officinale* (Orchidaceae)[J]. Plant mol biol. 104(4-5):529-548.
HONG K, ZHANG XM, YI Y, et al., 2010. Effect of nutrient elements on bud development and florescence of *Rhododendron delavayi* Franch[J]. North Hortic, (21): 84-86. [洪鲲，张习敏，乙引，等，2010. 营养元素对马缨杜鹃花芽发育和花期的影响[J]. 北方园艺，(21)：84-86.]
HOU SY, ZHAO GC, LIU RH, et al., 2015. Cloning, bioinformatics and molecular evolution analysis of *Ft4CL* in *Fagopyrum Tataricum*[J]. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed), 35(1): 411-415. [侯思宇，赵盖超，刘荣华，等，2015. 苦荞 *Ft4CL* 基因克隆、生物信息学及分子进化分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版)，35(1)：411-415.]
HU DM, DONG X, WU JM, et al., 2021. Comparison of floral traits of three *Rhododendron* species in different habitats[J]. Guihaia, 1-16. [胡德美，董溪，吴江明，等，2021. 不同生境三种杜鹃属植物花特征比较[J]. 广西植物，1-16.]
JIA Y, ZHANG FS, XIAO SX, et al., 2017. Component analyses of *Tussilago farfara* in different development stages by metabonomic and comparative transcriptomic approaches[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 33(6): 615-623. [贾岩，张福生，肖淑贤，等，2017. 款冬花不同发育阶段的代谢组学和比较转录组学分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报，33(6)：615-623.]
KANEHISA M & GOTO S, 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 28(1): 27-30.
LI GZ, QI XH, LI ML, ZHAO JL, et al., 2017. Research on transcriptome of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* flower buds at different development stages[J]. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed), 37(10): 701-706. [李改珍，齐仙惠，李梅兰，等，2017. 大白菜花发育不同时期的转录组研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版)，37(10)：701-706.]
LI WJ & CHEN X, 2005. A preliminary study on structure and regeneration of *Rhododendron Delavayi* population in Baili Azalea Forest Park[J]. Guizhou Sci, 23(3): 46-49. [李苇洁和陈训，2005. 百里杜鹃森林公园马缨杜鹃种群结构与更新初步研究[J]. 贵州科学，23(3)：46-49.]
LI Y, CHEN Y, ZHOU L, et al., 2020. MicroTom Metabolic Network: Rewiring tomato metabolic regulatory network throughout the growth cycle[J]. Mol Plant, 13(8): 1203-1218.
LIN H, RAO J, SHI JX, et al., 2014. Seed metabolomic study reveals significant metabolite variations and correlations among different soybean cultivars[J]. J Integr Plant Biol, 56(9): 826-836.
LOUIE GV, BOWMAN, TU Y, et al., 2010. Structure-function analyses of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference

[J]. Plant Cell, 22(12): 4114-4127.
MAO JN, 2000. A study on pollen morphology of 4 azalea (*Rhododendron*) species[J]. J Southwest Agric Univ, 22(6): 525-529. [毛加宁，2000. 杜鹃花属 4 种植物花粉形态特点研究[J]. 西南农业大学学报, 22(6):525-529.]
NIE JH, ZHANG FS, TIAN D, et al., 2018. Comparative transcriptomic analysis of leaves of *Tussilago farfara* in different development stages[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 49(13): 3095-3101. [聂佳慧，张福生，田栋，等，2018. 款冬叶不同发育阶段的转录组学分析[J]. 中草药，49(13)：3095-3101.]
PAN Y, CHEN DX, LI LY, 2020. Comparative transcriptomics analysis of *Citrus medica* var.*Sarcodactylis* at different developmental stages[J]. China J Chin Mater Med, 45(21): 5169-5176. [潘媛，陈大霞，李隆云，2020. 川佛手开花至凋谢过程中的比较转录组学分析[J]. 中国中药杂志，45(21)：5169-5176.]
PAN Y, ZHAO X, CHEN DX, 2021. Different development phase of transcription proteomics and metabolomics of flower of *Lonicera macranthoides*[J]. China J Chin Mater Med, 46(11): 2798-2805. [潘媛，赵晓，陈大霞，2021. 灰毡毛忍冬花不同发育阶段的转录组学与代谢组学研究[J]. 中国中药杂志，46(11)：2798-2805.]
RAO J, CHENG F, HU CY, et al., 2014. Metabolic map of mature maize kernels[J]. Metabolomics, 10(5): 775-787.
SHI XF, WEI RF, HUANG GY, et al., 2021. Study on the molecular mechanism of promotion of inflorescence formation of CCC treatment for the second fruiting in grape[J]. J Fruit Sci, 38(2): 153-167. [时晓芳，韦荣福，黄桂媛，等，2021. 矮壮素处理促进葡萄二季果成花的分子机制研究[J]. 果树学报，38(2)：153-167.]
SONG QF, ZHANG XM, YI Y, et al., 2010. Effect of spraying plant hormones on the flowering stage of wild *Rhododendron delavayi* Franch. [J]. Forest Sci Tech, (5): 52-53. [宋庆发，张习敏，乙引，等，2010. 喷施植物激素对野生马樱杜鹃花期的影响[J]. 林业实用技术，(5)：52-53.]
TU YH, LIU F, GUO DD, et al., 2016. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation[J]. BMC Plant Biol, 16(1): 132.
WANT EJ, WILSON ID, GIKA H, et al., 2010. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS[J]. Nat protoc, 5(6): 1005-1018.
WANG Y, YANG X, YANG RJ, et al., 2019. Advances in research of *MYB* transcription factors in regulating phenylpropane biosynthesis [J]. J Anhui Agric Univ, 46(5): 859-864. [王玉，杨雪，杨蕊菁，等，2019. 调控苯丙烷类生物合成的 *MYB* 类转录因子研究进展[J]. 安徽农业大学学报，46(5)：859-864.]
WARWICK B D, DAVID B, PAUL B, et al., 2011. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nat Protoc: Reci Res, 6(7): 1060-1083.
WEN B, MEI ZL, ZENG CW, et al., 2017. MetaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data[J]. BMC Bioinf, 18(1): 183.
WEN H, ZHANG DY, PENG C, et al., 2017. Transcriptional analysis of phenylpropanoid metabolic pathway in *Gastrodia elata* [J]. Chin Med Mat, 40(4): 789-796. [文欢，张大燕，彭成，等，2017. 天麻苯丙烷代谢途径的转录组学分析[J]. 中药材，40(4)：789-796.]
XU HX, LI XY, CHEN JW, 2020. Studies on the amino acid metabolism and carbohydrate metabolism variation during flower development in *Eriobotrya japonica*[J]. Hortic Plant J,

47(2): 233-241. [徐红霞，李晓颖，陈俊伟. 2020. 枇杷花发育进程中氨基酸和碳水物代谢的变化[J]. 园艺学报，47(2)：233-241.]

XU JJ, WHANG YH, WANG HS, et al., 2012. Chemical constituents from stems of *Rhododendron delavayi* Franch[J]. Nat Prod Res Dev, 24(6): 757-760. [徐金金，王跃虎，王鸿升，等，2012. 马缨杜鹃茎的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发，24(6)：757-760.]

XUE SY, WANG XJ, SUN HF, et al., 2012. Metabolomic study of flower buds of *Tussilago farfara* in different development stages by GC-MS[J]. China J Chin Mater Med, 37(19): 2863-2869. [薛水玉，王雪洁，孙海峰，等，2012. 基于气质联用的款冬花蕾动态发育代谢组学特征分析[J]. 中国中药杂志，37(19)：2863-2869.]

YUE BC, 2015. Study on characteristics of the flower bud development and blooming control of *Rhododendron delavayi*[D]. Zhongkai Univ Agric Eng. [岳保超， 2015. 马缨杜鹃的花芽发育特征研究及花期调控初探[D]. 仲恺农业工程学院.]

ZHANG CQ, HUANG CL, HUANG JY, et al., 2015. Investigation of germplasm resources of the genus *Rhododendron* in Baili nature reserve in Guizhou[J]. Plant Diversity Resour, 37(3): 357-364. [张长芹，黄承玲，黄家勇，等，2015. 贵州百里杜鹃自然保护区杜鹃花属种质资源的调查[J]. 植物分类与资源学报，37(3)：357-364.]

ZHANG JJ, WANG X, YU O, et al., 2011. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) during fruit development and maturation[J]. J Exp Bot, 62(3): 1103-1118.